



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 16 456 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/04

②1 Aktenzeichen: 197 16 456.0
②2 Anmeldetag: 21. 4. 97
④3 Offenlegungstag: 22. 10. 98

DE 197 16 456 A 1

⑦1 Anmelder:
Schmitt, Heinz-Josef, Prof. Dr., 24105 Kiel, DE

⑦4 Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

⑤6 Entgegenhaltungen:
WO 13 396 A2
Chemical Abstracts 124 (1996):221903c;
Chemical Abstracts 123 (1995):161942g;
Chemical Abstracts 115 (1991):130899d;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤4 Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen, insbesondere Erregern von Infektionskrankheiten
- ⑤7 Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen, insbesondere Erregern von Infektionskrankheiten, mittels gleichzeitiger Amplifikation mehrerer Zielsequenzen in einem Reaktionsgefäß, in einem sog. Multiplex-PCR Verfahren, indem eine Patientenprobe mit einer aus einer Mehrzahl von Primern bestehenden Primerlösung in Kontakt gebracht wird und eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) veranlaßt wird, wobei für nur eine RNA besitzende Erreger ein Teil der Patientenprobe einer vorherigen reversen Transkription unterworfen wird, um sodann das PCR-Produkt einem digoxigenin-labeling mit entsprechend den Primern gewählten Sonden unterworfen werden, und anschließend durch capture probe-Auswertung und/oder photometrische auswertbare Farbwertänderung der Probe eine Information über das Vorhandensein eines zu dem Primer gehörigen Mikroorganismus zu erhalten.

DE 197 16 456 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen, insbesondere Erregern von Infektionskrankheiten.

Erreger von Infektionskrankheiten, insbesondere solchen des menschlichen Atmungstraktes, können insbesondere bei geschwächten Patienten (z. B. mit Herz-Kreislaufkrankheiten oder mit Krebs) besonders schwere Krankheitsverläufe auslösen. Aber auch schon "normale" Erkältungskrankheiten sind die häufigsten Krankheiten bei Menschen schlechthin. Der dadurch bedingte Ausfall an Arbeit und Geld geht allein in der Bundesrepublik Deutschland jährlich in astronomische Höhen. Ursache sind verschiedene Mikroorganismen, die nur eine vergleichsweise geringe Abwehrleistung des Körpers anregen, weswegen immer wieder solche Infektionen stattfinden können. Wenigstens ein Teil dieser Erreger ist heutzutage mit Antibiotika zu behandeln, wobei leider bisher nicht bekannt ist, wie man diese Erreger allein aufgrund der Symptome der Patienten voneinander unterscheiden könnte. Die bisher bekannten Methoden zum Nachweis der Erreger von Erkältungskrankheiten sind extrem aufwendig, langwierig und teuer.

Zum einen ist die Kultur von geringer Praktikabilität, da das Ergebnis erst nach langer Zeit, wenigstens Tagen, meistens Wochen, vorliegt, sie extrem aufwendig und daher kostenintensiv ist und nicht zuletzt eine niedrige Sensitivität aufweist; die mittlere Liegezeit in der Pädiatrie beträgt drei bis fünf Tage, so daß der Patient in der Regel schon zu Hause ist, wenn der Erreger nachgewiesen wird. Für die akute Patientenversorgung ist die Kultur der Erreger daher unbrauchbar.

Die weiter bekannte Serologie, bei der ein Anstieg der Antikörper gegen einen Erreger beim Patienten untersucht wird, hat ebenfalls eine sehr lange Vorlaufzeit zur Bedingung. Man muß zwei Blutproben des Patienten, die mit einem Abstand von drei bis vier Wochen entnommen werden, vergleichen.

Für die Versorgung des Patienten ist es von entscheidender Bedeutung, daß der für den jeweiligen Erreger richtige Wirkstoff oder ggf. auch kein Antibiotikum eingesetzt wird. Weiter müssen im Krankenhaus je nach Erreger, der den Patienten infiziert hat, verschiedene Isolierungsmaßnahmen getroffen werden müssen, wie z. B. das Kohortieren von Patienten mit einem Erreger in einem Zimmer, die dann nur von einer Pflegekraft gepflegt werden. Es ist daher von großer Bedeutung, daß der jeweilige Erreger schnell erkannt wird.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein schnelles Verfahren zum Nachweis der in Betracht kommenden Mikroorganismen zu schaffen.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Merkmale des Hauptanspruches gelöst. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung wieder.

Mit Hilfe der beschriebenen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gelingt es erstmals, auch Erreger des Respirationstraktes rasch und zuverlässig nachzuweisen. Dabei können gleichzeitig mehrere Zielsequenzen in einem Reaktionsgefäß amplifiziert werden (Multiplex-PCR). Es wird auf diese Weise möglich, epidemiologische Untersuchungen vorzunehmen, um herauszufinden, welche Erreger wie häufig in welcher Population Krankheiten des Respirationstraktes hervorrufen, und dem behandelnden Arzt innerhalb eines Arbeitstages mitzuteilen, ob der Patient von einer Behandlung mit einem bestimmten Antibiotikum profitiert oder nicht. Diese Entscheidung konnte in der Vergangenheit nicht adäquat getroffen werden, da keine objektive Entscheidungshilfe zur Verfügung stand.

Die hier zur Anwendung kommende diagnostische Multiplex-PCR ermöglicht es dagegen, eine Entscheidung bezüglich der Gabe von Antibiotika rasch aufgrund der aufgefundenen Erreger zu treffen. Z. B. sind Infektionskrankheiten durch Mykoplasmen oder Chlamydien mit einem Makrolidantibiotikum therapierbar, während es für die viralen Erreger bisher keine Therapie gibt. Wird kein Erreger nachgewiesen, so ist nach je nach klinischen Befunden eine bakterielle Genese zu vermuten, bei der man mit einem Betalaktamantibiotikum (Pneumokokken, Haemophilus) behandeln muß.

Das bei der Realisierung insbesondere auftretende Problem, verschiedene Primer in einer Multiplex-PCR zu kombinieren, ist durch die in den Unteransprüchen aufgeführten Primer gelöst.

Dabei gibt die gewählte Auswahl wenigstens der Primer

- Chlamydia pneumoniae
CpnA 5'-TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC-3',
CpnB 5'-CGC CTC TCT CCT ATA AAT-3' und
- Mykoplasma pneumoniae
MP1 5'-AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT-3',
MP2 5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'

einen Hinweis, ob mit einem Makrolidantibiotikum therapiert werden muß, und die Gesamtzahl der neun verschiedenen Primer CpnA,-B; MP1,-2; EV1,-2; RSV1,-2; InfA NS1, NS2; InfB NS1, NS2; Adh1,-2; PIV1 1, 2; PIV3 1, 3 erfaßt alle üblichen Erkältungskrankheiten, so daß bei einem negativen Befund auf eine bakterielle Genese rückgeschlossen werden kann.

Bei Auffinden lediglich der viralen Mikroorganismen ergibt sich zwar kein direkter Therapie-Hinweis aber epidemiologische Untersuchungen sowie entsprechende Kohortierung mit Patienten, die durch das gleiche Virus infiziert sind, werden möglich und krankenhauserworbene Infektionen lassen sich vermeiden.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus nachfolgender Beschreibung einer bevorzugten Probenaufbereitung und der Durchführung des Verfahrens mit geeigneten Primern und Sonden.

In einer zunächst für die Versuche verwendeten Probenaufbereitung werden beispielsweise 100 µl Nasopharyngealsekret mit 100 µl 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol in einer Zusammensetzung 25 : 24:1 in einer Endkonzentration von 0,1% SDS extrahiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation auf einer Tischzentrifuge wird die obere wäßrige Phase abgehoben, mit Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 ausgeschüttelt und 2 min zentrifugiert. Die Nukleinsäuren im Überstand werden mit 2,5 Volumen Ethanol bei einer Endkonzentration von 0,3 M Natriumacetat für 5 min bei -70° c gefällt und 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 15 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltem H₂O bidest aufgenommen.

Anschließend werden 5 µl in einem 20 µl Reaktionsansatz mit 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, jeweils 1 mM dATP, dCTP, dTTP und dGTP (z. B. von Pharmacia), 0.2 µg/µl Hexanucleotid-Mix (z. B. von Boehringer Mannheim), 20 U RNasin (z. B. Promega) und 10 U Mu-MLV Reverse Transkriptase (z. B. Eurogentec) (–jeweils Endkonzentrationen–) für 60 min bei 37°C revers transkribiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms für 5 min bei 90°C werden die 20 µl in der Multiplex-PCR eingesetzt.

Dort erfolgt in einem 80 µl Reaktionsansatz bei 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine, jeweils 0.2 mM dATP, dCTP und dGTP, 0.19 mM dTTP, 0.01 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim), je 1 µM jeder Primerlösung (s. u.) und 5 U AmpliTaq-Gold Polymerase (Perkin-Elmer) die Polymerase-Kettenreaktion.

Die PCR-Reaktion erfolgt im Thermoblock eines PCR-Thermocyclers (PE 9600 Perkin Elmer) nach einer ersten 10-minütigen Denaturierung bei 94°C unter Verwendung eines Temperaturprofils mit insgesamt 40 Zyklen aus jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, Hybridisierung der Primer bei 50°C und DNA-Synthese bei 72°C, sowie einer abschließenden 7-minütigen Inkubation bei 72°C.

Für die Differenzierung der PCR-Produkte schließt sich ein PCR-ELISA (Boehringer) an. Die Digoxigenin-markierten Amplifikate werden mit Hilfe spezifischer biotinmarkierter Sonden an mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert. Das gebundene Hybrid kann mit einem Anti-Digoxigenin-Peroxidase Konjugat und einem Farbsubstrat detektiert werden.

Hierfür werden in die Vertiefungen der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten jeweils 25 µl Denaturierungslösung (0.2 N NaOH, 0.1% SDS) und 5 µl eines PCR-Produktes gegeben. Es werden pro PCR-Produkt jeweils 9 Vertiefungen beschickt. Nach 10-minütiger Denaturierung erfolgt die Zugabe der 9 verschiedenen Hybridisierungslösungen, die sich aus der jeweiligen biotinylierten Sonde (Endkonzentration 7.5 pmol/ml; Sequenzen s. u.) und Hybridisierungspuffer (Boehringer Mannheim) zusammensetzen.

Nach einer Stunde Schütteln bei 37°C wird die Platte drei- bis fünfmal mit Waschlösung gewaschen und je 200 µl eines Anti-dig-Peroxidase-Konjugates in die Vertiefung gegeben. Nach 30 min Schütteln bei 37°C wird nochmals gewaschen und das Farbsubstrat ABTS in die Vertiefungen pipettiert, woraufhin nach 30 min Schütteln bei 37°C der Farbumschlag photometrisch in einem ELISA-Lesegerät bei 405 nm gemessen werden kann. Es wird ein Referenzfilter von 490 nm verwendet. Es werden also lediglich in den Vertiefungen, in denen durch die Sonden PCR-Produkt und die Anti-dig Peroxidase am Streptavidin haften, Farbveränderungen eintreten.

In der anliegenden Liste werden die verwendeten Primer sowie die hierzu passenden verwendeten Sonden angegeben:
Verwendete Primer:

Enterovirus: EV1 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'

EV2 5'-TCC TCC GGC CCC TGA ATG CG-3'

Mycoplasma pneumoniae: MP1 5'-AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT-3'

MP2 5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'

Influenzavirus Typ A: InfA NS1 5'-AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG-3'

InfA NS2 5'-CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC-3'

Influenzavirus Typ B: InfB NS1 5'-ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC-3'

InfB NS2 5'-TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG-3'

Adenovirus: Adh1 5'-GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA-3'

Adh2 5'-**ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA-3'**

Chlamydia pneumoniae: CpnA 5'-TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC-3'

CpnB 5'-CGC CTC TCT CCT ATA AAT-3'

Parainfluenzavirus Typ 1:

PIV1 1 5'-CAC ATC CTT GAG TGA TTA AGT TTG ATG A-3'

PIV1 2 5'-ATT TCT GGA GAT GTC CCG TAG GAG AAC-3'

Parainfluenzavirus Typ 3:

PIV3 1 5'-TAG CAG TAT TGA AGT TGG CA-3'

PIV3 2 5'-AGA GGT CAA TAC CAA CAA CTA-3'

Respiratory Syncytial Virus (RSV):

RSV1 5'-TGT TAT AGG CAT ATC ATT GA-3'

RSV 2 5'-TTA ACC AGC AAA GTG TTA GA-3'

Sonden (3'-Ende biotinyliert):

Enterovirus: EV3 5'-GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA-3'

Mycoplasma pneumoniae: MP3 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A-3'

Influenzavirus Typ A: InfA3 5'-GTC CTC ATC GGA GGA CTT GAA TGG AAT GAT-3'

Influenzavirus Typ B: InfB3 5'-GTC AAG AGC ACC GAT TAT CAC C-3'

Adenovirus: Adh 3: 5'-CTC GAT GAC GCC GCG GTG C-3'

Chlamydia pneumoniae: CpnC 5'-TCT TGC TAC CTT CTG TAC TAA C-3'

Parainfluenzavirus Typ 1: PIV1C 5'-TAC CTT CAT TAT CAA TTG GTA AGT CAA
TAT ATG -3'

Parainfluenzavirus Typ 3: PIV3C 5'-AAA ATT CCA AAA GAG ACC GGC -3'

RSV: RSV3 5'-TAC ACC TGC ATT AAC ACT AA-3'

Vorteilhaft wäre zudem, mit dem Verfahren der "Reserven Hybridisierung" immobilisierte Sonden in separaten Regionen auf einem Trägermaterial anzuordnen, auf das dann lediglich zur Auswertung jeweils PCR-Produkt zu geben wäre.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen, insbesondere Erregern von Infektionskrankheiten, **gekennzeichnet durch**

- eine gleichzeitige Amplifikation mehrerer Zielsequenzen in einem Reaktionsgefäß, einem sog. Multiplex-PCR, in dem eine Patientenprobe mit einer aus einer Mehrzahl von Primer bestehenden Primertlösung in Kontakt gebracht wird und eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) veranlaßt wird,
- wobei für nur eine RNA besitzende Erreger ein Teil der Patientenprobe einer vorherigen reversen Transkription unterworfen wird,
- um sodann das PCR-Produkt einem digoxigeninlabeling mit entsprechenden den Primern gewählten Sonden unterworfen werden,
- und anschließend durch capture probe-Auswertung und/oder photometrische auszuwertbare Farbwertänderung der Probe eine Information über das Vorhandensein eines zu dem Primer gehörigen Mikroorganismus zu erhalten.

2. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Primer ein Mycoplasma pneumoniae MP1, MP2 und Chlamydia pneumoniae CpnA, CpnB verwandt werden zur Feststellung auf Makrolidantibiotika-empfindliche Mikroorganismen.

3. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein RSV-Primer (respiratory syncytial virus) RSV1, RSV2 verwandt wird.

4. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Enterovirusprimer EV1, EV2 verwandt wird.

5. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Influenzavirusprimer Typ A und Typ B InfA NS1, InfA NS2 und InfB NS1, InfB NS2 verwandt werden.

6. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Adenovirusprimer Adh1 5'-GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA-3', Adh2 5'-ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA-3' verwandt wird.

7. Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Parainfluenzavirusprimer Typ1 PIV1 1, PIV1 2 und Typ 3 PIV3 1, PIV 3 2 verwandt werden.

8. Verfahren zum Nachweis aller therapeutisch relevanten Mikroorganismen des Respirationstraktes, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer

Enterovirus: EV1 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'

EV2 5'-TCC TCC GGC CCC TGA ATG CG-3'

Mycoplasma pneumoniae: MP1 5'-AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT-3'

MP2 5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'

Influenzavirus Typ A: InfA NS1 5'-AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG-3'

InfA NS2 5'-CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC-3'

Influenzavirus Typ B: InfB NS1 5'-ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC-3'

InfB NS2 5'-TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG-3'

Adenovirus: Adh1 5'-GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA-3'

Adh2 5'-ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA-3'

Chlamydia pneumoniae: CpnA 5'-TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC-3'

CpnB 5'-CGC CTC TCT CCT ATA AAT-3'

Parainfluenzavirus Typ 1:

PIV1 1 5'-CAC ATC CTT GAG TGA TTA AGT TTG ATG A-3'

PIV1 2 5'-ATT TCT GGA GAT GTC CCG TAG GAG AAC-3'

Parainfluenzavirus Typ 3:

PIV3 1 5'-TAG CAG TAT TGA AGT TGG CA-3'

PIV3 2 5'-AGA GGT CAA TAC CAA CAA CTA-3'

Respiratory Syncytial Virus (RSV):

RSV1 5'-TGT TAT AGG CAT ATC ATT GA-3'

RSV 2 5'-TTA ACC AGC AAA GTG TTA GA-3'

in Kombination miteinander nach ggf. reverser Transkription eines Teils der Patientenproben in ein Multiplex PCR gegeben werden, und anschließend am 3'-Ende biotinylierten Hybridisierungslösungen

Sonden (3'-Ende biotinyliert):

Enterovirus: EV3 5'-GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA-3'

Mycoplasma pneumoniae: MP3 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A-3'

Influenzavirus Typ A: InfA3 5'-GTC CTC ATC GGA GGA CTT GAA TGG AATGAT-3'

Influenzavirus Typ B: InfB3 5'-GTC AAG AGC ACC GAT TAT CAC C-3'

Adenovirus: Adh3a 5'- **CTC GAT GAC GCC GCG GTG C-3'**

Chlamydia pneumoniae: CpnC 5'-TCT TGC TAC CTT CTG TAC TAA C-3'

Parainfluenzavirus Typ 1: PIV1C 5'-TAC CTT CAT TAT CAA TTG GTA AGT CAA

TAT ATG -3'

Parainfluenzavirus Typ 3: PIV3C 5'-AAA ATT CCA AAA GAG ACC GGC -3'

RSV: RSV3 5'-TAC ACC TGC ATT AAC ACT AA-3'

als Sonden verwandt werden.

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)